## PATENT COOPERATION THEATY

	From the INTERNATIONAL BUREAU
PCT	То:
NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE  (PCT Rule 92bis.1 and Administrative Instructions, Section 422)  Date of mailing (day/month/year) 01 October 2001 (01.10.01)	WABLAT, Wolfgang Potsdamer Chaussee 48 D-14129 Berlin ALLEMAGNE
01 October 2001 (01.10.01)	
Applicant's or agent's file reference GES-15 559 WO	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/DE00/00528	International filing date (day/month/year) 18 February 2000 (18.02.00)
The following indications appeared on record concerning:      The applicant the inventor	the agent the common representative
Name and Address	State of Nationality State of Residence DE DE
	Telephone No.
·	Facsimile No.
	Teleprinter No.
- The state of the	A thirt is a face to be a second an apparature
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the X the person the name the add	
Name and Address	State of Nationality State of Residence
MAGFORCE APPLICATIONS GMBH	DE DE
c/o CBN, Haus 30 Spandauer Damm 130 14050 Berlin	Telephone No.
Germany	Facsimile No.
	Teleprinter No.
3. Further observations, if necessary: Following an assignment, the applicant in Box (a designated States except US.	2) has been recorded as applicant for all
4. A copy of this notification has been sent to:	
X the receiving Office	the designated Offices concerned
the International Searching Authority	X the elected Offices concerned
X the International Preliminary Examining Authority	other:
The International Property of WIPO	Authorized officer
The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes	Ellen MOYSE
1211 Geneva 20, Switzerland	
Facsimile No : (41-22) 740 14 35	Telephone No.: (41-22) 338 83 38

					in the second se
The Proof of the	tive - 140				- 4
1.17 (1884)					*
		35-44 to		tri pro en l'adrica	a Jagunty .
					4
					<b>*</b> .
ten, to		· 4-	. Mil. 1	45 sowet on y take	리추 왕 ( <b>목) 병</b> 소 ()
					127 9 %
			30		
					÷.
				₹	
14				\$ <b>.</b>	
				the second	
	i.	*			
		9		-1	and the second

### Copy for the Elected Office (EO/!

# PATENT COOPERATION TREATY

	From the INTERNATIONAL BUREAU	
PCT	То:	
NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE  (PCT Rule 92bis.1 and Administrative Instructions, Section 422)  Date of mailing (day/month/year) 01 October 2001 (01.10.01)	WABLAT, Wolfgang Potsdamer Chaussee 48 D-14129 Berlin ALLEMAGNE	
Applicant's or agent's file reference		
GES-15 559 WO	IMPORTANT NOTIFICATION	
International application No. PCT/DE00/00528	International filing date (day/month/year) 18 February 2000 (18.02.00)	
The following indications appeared on record concerning:      X the applicant     X the inventor	the agent the common representative	
Name and Address	State of Nationality State of Residence DE DE	
JORDAN, Andreas Dahlemer Weg 63 A D-14167 Berlin Germany	Telephone No.	
Comany	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that t	he following change has been recorded concerning:	
the person the name the add		
Name and Address	State of Nationality State of Residence DE DE	
JORDAN, Andreas Dahlemer Weg 63 A D-14167 Berlin Germany	Telephone No.	
Germany	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
3. Further observations, if necessary: Following an assignment of rights, the above-m as applicant/inventor for the US only.	nentioned applicant/inventor is now recorded	
4. A copy of this notification has been sent to:		
X the receiving Office	the designated Offices concerned	
the International Searching Authority	X the elected Offices concerned	
X the International Preliminary Examining Authority	other:	
The International Process of Manage	Authorized officer	
The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Ellen MOYSE	
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38	



### ATENT COOPERATION TREATY

	From the INTERNATIONAL BUREAU
PCT	To:
NOTIFICATION OF ELECTION (PCT Rule 61.2)	Assistant Commissioner for Patents United States Patent and Trademark Office Box PCT Washington, D.C.20231 ETATS-UNIS D'AMERIQUE
Date of mailing (day/month/year) 24 October 2000 (24.10.00)	in its capacity as elected Office
International application No. PCT/DE00/00528	Applicant's or agent's file reference GES-15 559 WO
International filing date (day/month/year) 18 February 2000 (18.02.00)	Priority date (day/month/year) 10 March 1999 (10.03.99)
Applicant	
JORDAN, Andreas	
The designated Office is hereby notified of its election made  in the demand filed with the International Preliminary  18 September  in a notice effecting later election filed with the International Preliminary  2. The election   was	Examining Authority on: 2000 (18.09.00)
was not  made before the expiration of 19 months from the priority d Rule 32.2(b).	ate or, where Rule 32 applies, within the time limit under

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Antonia Muller

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

		<b>~</b>	ক্ষিত্র সূত্রী বিশ্ব করিবলৈ । বিশ্ব করিবলৈ বিশ্ব করিবলৈ ।
		a maj il berner in a	• • • • • • • • • • • • • • • • • • •
<b>W</b>			
	12		
		and the second s	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
			.8
			.s #
	,		. · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
· ·			
	A .		
A Company of the Comp			
<u>.</u>		· ····································	
*		en e	





# PCT TORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 7:

C12N 5/08, C12M 3/04, G01N 1/06

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/53728 **A2** 

IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:

14. September 2000 (14.09.00)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/DE00/00528

(22) Internationales Anmeldedatum: 18. Februar 2000 (18.02.00)

(30) Prioritätsdaten:

199 12 798.0

10. März 1999 (10.03.99)

DE

(71)(72) Anmelder und Erfinder: JORDAN, Andreas [DE/DE]: Dahlemer Weg 63 A, D-14167 Berlin (DE).

(74) Anwalt: WABLAT, Wolfgang; Potsdamer Chaussee 48. D-14129 Berlin (DE).

Veröffentlicht

Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR,

(81) Bestimmungsstaaten: AU, CN, JP, KR, US, eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches

(54) Title: METHOD FOR CULTIVATING CANCER CELLS FROM HUMAN TISSUE AND DEVICE FOR PREPARING TISSUE SAMPLES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR KULTIVIERUNG VON KREBSZELLEN AUS HUMANGEWEBE UND VORRICHTUNG ZUR AUFBEREITUNG VON GEWEBEPROBEN

#### (57) Abstract

The invention relates to a method for cultivating cancer cells for scientific serial assays, wherein a tissue sample which is heterogeneous with respect to contaminants, normal cells and tumor cells is locally separated in a sequential-parallel splitting method. The locally separated sample segments are further split, wherein the tissue fragments and liquids of the tissue segments are separately placed in a given cell culture medium and grown under predetermined culture conditions. The invention also relates to a cell culture medium and a device for splitting the tissue samples into disc segments. The inventive method combined with the splitting device and the culture medium enables fast cultivation of cancer cells obtained from human tissue with a multiplication rate of 100 % in all types of tumors.

#### (57) Zusammenfassung

Bei einem Verfahren zur Kultivierung von Krebszellen für naturwissenschaftliche Reihenuntersuchungen wird eine in bezug auf Kontaminanten, Normalzellen und Turmorzellen heterogene Gewebeprobe in einem sequentiell-parallelen Schneidvorgang örtlich aufgelöst. Die ortsaufgelösten Probensegmente werden weiter geteilt, wobei die Gewebefragmente und -flüssigkeiten

der Gewebesegmente separat in einem bestimmten Zellkulturmedium unter vorgegebenen Kulturbedingungen zum Wachstum gebracht werden. Es werden ein Zellkulturmedium sowie eine Vorrichtung zum Teilen der Gewebeprobe in Scheibensegmente angegeben. Mit dem Verfahren wird in Verbindung mit der Schneidvorrichtung und dem Kulturmedium bei allen Tumorarten eine schnelle Kultivierung von aus Humangewebe gewonnenen Krebszellen mit einer Angehrate von 100 % erreicht.

H

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
ΑT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
ΑU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
ΑZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Моласо	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	ТJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungam	ML	Mali	TT	
BJ	Benin	ΙE	Irland	MN	Mongolei	UA	Trinidad und Tobago Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Uganda
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Amerika
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande		Usbekistan
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	VN	Vietnam
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neusceland	YU	Jugoslawien
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen	ZW	Zimbabwe
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG			
~-		LR	Liveria	SG	Singapur		

#### Beschreibung

Verfahren zur Kultivierung von Krebszellen aus Humangewebe und Vorrichtung zur Aufbereitung von Gewebeproben

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Kultivierung von Krebszellen aus Humangewebe für naturwissenschaftliche, vorzugsweise molekularbiologische und zellbiologische Reihenuntersuchungen sowie ein Zellkulturmedium zur Durchführung des Verfahrens und eine Vorrichtung zur Aufarbeitung der Gewebeproben.

15

20

25

30

35

10

5

Für molekularbiologische Untersuchungen, vor allem mit prädiktiver Intention, ist die Kultur von primären, aus Feinnadel- und Stanzbiopsien gewonnenem Zellmaterial von zentraler Bedeutung. Bei den bekannten Methoden ist jedoch die "Angehrate" der aus Humangewebe isolierten Zellen sehr gering. Bei manchen Tumorarten ist eine Zellkultivierung bisher nicht gelungen. Diese Problematik ist zum einen dadurch begründet, daß die das Tumorgewebe umgebenden Normalzellen und/oder die das Tumorgewebe infiltrierenden Bindegewebszellen als erste wachsen und so die Tumorzellen, die für die Untersuchungen gewonnen werden sollen, überwachsen und am Wachstum hindern. Eine erfolgreiche Kultivierung von Krebszellen wird darüber hinaus durch vielfältige Kontaminationen, insbesondere mit Bakterien oder Pilzen, verhindert.

Die bisher für die Kultivierung von Tumorzellen verwendeten Zellkulturmedien, wie RPMI 1640, Basal Medium Eagle, ISCOVE's, Medium 199, Leibovitz L-15. u.a., sind nicht in der Lage, das Wachstum der Krebszellen in ausreichendem

Maße zu fördern bzw. das der Normalzellen und bakteriellen Kontaminanten zu verhindern. Der bisher übliche un-

2

PCT/DE00/00528

kontrollierte Einsatz von Antibiotika wirkt zwar den negativen Einflüssen der Kontaminanten entgegen, behindert aber gleichzeitig das Wachstum der Tumorzellen.

Bei den bekannten Verfahren zur Kultivierung von Krebszellen erfolgt die Aufbereitung der aus Feinnadel- oder Stanzbiopsien gewonnenen Gewebeproben durch eine mecha-10 nisch-enzymatische Gewebe-Disaggregation, bei der der heterogene, aus verschiedenen Schichten bestehende, die Gewebeprobe bildende Stanzzylinder durch eine Feinzerkleinerung als Ganzes in eine breiige Masse zerteilt und mit Hilfe von Enzymen in einzelne Zellen umgewandelt werden 15 soll. Durch diese Feinzerkleinerung wird aber die heterogene Struktur der entnommenen Gewebeprobe zerstört und es erfolgt eine intensive Vermischung der Tumorzellen mit den Normalzellen und Kontaminanten. Zum einen wird die Vitalität der Tumorzellen durch die Feinzerkleinerung be-20 einträchtigt. Andererseits ist durch die Zerstörung der Heterogenität der Gewebeprobe der Probematerialbrei mit Normalzellen und Kontaminanten durchsetzt, so daß das Wachstum der Tumorzellen aus den oben genannten Gründen vermindert oder sogar vollständig verhindert wird. Bei 25 dieser Art der mechanisch-enzymatischen Gewebe-Desaggregation des Gesamtmaterials sind Aussagen über die Struktur des Tumors nicht möglich.

30

35

WO 00/53728

5

Bei den bisher bekannten Verfahren zur Vermehrung und Reinigung des aus einer Gewebeprobe gewonnenen Tumormaterials wird die Zellvermehrung durch Transplantation des Tumormaterials auf eine Nacktmaus vorgenommen (Xeno-Transplantat). Bei diesem Verfahren können zwar Angehraten des transplantierten Tumorgewebes von 50 % und gelegentlich auch mehr erreicht werden, jedoch vergehen - je nach Tumorart und Eigenschaften - mehrere Wochen oder gar Monate, ehe sich eine Zellvermehrung in vivo einstellt. Aufgrund des erheblichen Aufwands und der Zeitdauer haben Routinetests mit patientenindividuellen Primärzellen für eine Verlaufskontrolle und prädiktive Zwecke bisher nicht Eingang in die klinische Anwendung gefunden. Aufgrund der langwierigen und oftmals vergeblichen Versuche zur Kultivierung des vom Patienten entnommenen Gewebematerials liegen die Testergebnisse viel zu spät vor, um in einem Routineverfahren aus den Versuchsergebnisse eine rechtzeitige Änderung des Therapieregimes vornehmen zu können. Neben dem hohen Zeitaufwand ist auch die erforderliche Durchführung von Tierversuchen und der hohe Kostenaufwand

3

PCT/DE00/00528

WO 00/53728

nachteilig.

5

10

15

35

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein von Tierversuchen unabhängiges Verfahren zur Kultivierung von 20 Krebszellen aus Humangewebeproben anzugeben, das in einem vergleichsweise kurzen Zeitraum von wenigen Tagen eine sichere Vermehrung von Tumorzellen aus einer Gewebeprobe gewährleistet und reproduzierbare Aussagen über die Struktur und die Malignität des Tumors sowie Wachstumsund Strukturänderungen oder therapeutische Effekte zu-25 läßt. Ein weiteres Ziel der Erfindung besteht in der Bereitstellung einer auf dem Verfahren beruhenden Vorrichtung zur reproduzierbaren Aufbereitung von Gewebeproben sowie einem geeigneten Zellkulturmedium zur Vermehrung 30 von Krebszellen in vitro.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe mit einem Verfahren zur Kultivierung von Krebszellen gemäß den Merkmalen des Patentanspruchs I gelöst.

5

10

15

20

25

30

35

Der Grundgedanke der Erfindung besteht dabei darin, daß die Gewebeprobe in einem sequentiell-parallelen Schneidvorgang in eine Mehrzahl separater Gewebesegmente aufgeteilt wird und somit die auf der Grundlage von Kontaminanten, Normalzellen und Tumorzellen heterogene Gewebeprobe bzw. deren Heterogenität örtlich aufgelöst wird. Die Gewebesegmente werden dann jeweils separat weiter zerkleinert und die so gebildeten kleinen, separierten Gewebefragmente und -flüssigkeiten sowie die bei der sequentiell-parallelen Teilung der Gewebeprobe entstandene, ebenfalls jeweils separat gewonnene Gewebeflüssigkeit werden in einem spezifischen Zellkulturmedium und unter ausgewählten Kulturbedingungen kultiviert. Durch die örtliche Auflösung der Gewebeprobe werden die Einflüsse von in dieser vorhandenen Normalzellen, die bei üblicher - mechanischer oder enzymatischer -Aufbereitung der Gewebeprobe ein Überwachsen der Tumorzellen bewirken, ausgeschaltet oder zurückgedrängt. Gleichermaßen wird das Ausmaß von Kontaminationen, wie Pilze oder Bakterien, wesentlich reduziert bzw. erforderliche Antibiotika, die die Vermehrung von Tumorzellen bekanntermaßen stören, können sparsam und gezielt eingesetzt werden, ohne sich auf die Krebszellenkultivierung negativ auszuwirken.

Das vorgeschlagene Verfahren wird in weiterer Ausbildung der Erfindung durch ein für sehr geringe Gewebemengen geeignetes Zellkulturmedium in der im Anspruch 8 wiedergegebenen Zusammensetzung sowie durch die im Anspruch 5 hinsichtlich der Sauerstoff- und Kohlendioxidatmosphäre, der Luftfeuchte und der Temperatur sowie der Verwendung einer Biomatrix dargelegten Kultivierungsbedingungen vorteilhaft ergänzt. Insgesamt werden somit Bedingungen geschaffen, unter denen das Wachstum der Krebszellen geför-

dert und das der Normalzellen und Kontaminanten wesentlich eingeschränkt oder sogar vollständig ausgeschaltet wird.

5

10

15

Weitere vorteilhafte Verfahrensmerkmale ergeben sich aus den Unteransprüchen. So wurde beispielsweise gefunden, daß die Tumorzellen in Anwesenheit von Erythrozyten, die unmittelbar von der Entnahmestelle der Gewebeprobe am Patienten stammen, besonders schnell wachsen und eine höhere "Angehrate" besitzen als Zellen, die nur im reinem Zellkulturmedium zum Wachstum gebracht werden. Darüber hinaus hat es sich als vorteilhaft erwiesen, wenn die Gewebeprobe mindestens 2 Stunden, aber nicht länger als 24 Stunden, bei etwa 4°C bis 12°C in einem Zellkulturmedium aufbewahrt wird, um bereits jetzt an das Zellkulturmedium, in dem später die Vermehrung der Krebszellen erfolgen soll, angepaßt zu werden. Unter den aufgeführten Verfahrensbedingungen ist eine Adhäsion der Tumorzellen aus den aufbereiteten Gewebefragmenten an einer Biomatrix in der Zellkulturflasche bereits nach 1 bis 12 Stunden zu verzeichnen, sofern eine dem Gewebeentnahmeart identische Kulturtemperatur eingestellt wird.

25

30

35

20

Mit der vorliegenden und weiter unten in einem Ausführungsbeipiel detailliert beschriebenen Erfindung wird somit ein Verfahren zur Vermehrung von Tumorzellen in vitro angegeben, mit dem in einem vergleichsweise kurzen Zeitraum bei allen Tumorarten eine Kultivierung von aus Humangewebe gewonnenen Zellen mit einer "Angehrate" von 100 gelingt. Gegenüber der auf der Nacktmaus (Xeno-Transplantat) erzielten Zellvermehrung, bei der Angehraten von etwa 50 % erzielt werden, werden nicht nur Tierversuche vermieden und Kosten gespart, sondern es ist auch eine drastische Verkürzung der für die Vermehrung

des Zellmaterials benötigten Zeit zu verzeichnen, die gegenüber einem Zeitraum von mehreren Wochen oder gar Monaten beim Tumorwachstum in vivo bei dem erfindungsgemäß vorgeschlagenen Verfahren in der Regel bei lediglich 1 - 10 Tagen liegt.

Dadurch ist es erstmals möglich, Routineuntersuchungen für die Verlaufskontrolle von Krebserkrankungen und für prädiktive Zwecke (Sensibilitätstest mit Strahlen, Chemotherapie, Hyperthermie) oder zur Früherkennung von Resistenzen zur Identifikation neuer Antikrebswirkstoffe, als Ergänzung für zytologische oder histopathologische Gewebebefunde und in der Grundlagenforschung auf einfache und reproduzierbare Weise schnell und kostengünstig durchzuführen.

5

35

Nach einem weiteren Merkmal der Erfindung ist zur erfindungsgemäß ortsaufgelösten Aufbereitung der Gewebeprobe 20 als entscheidende Voraussetzung für die erfolgreiche Zellvermehrung eine Vorrichtung gemäß den Merkmalen des Anspruchs 9 vorgesehen. Diese Vorrichtung besteht zum einen aus einem Schneidapparat zum sequentiell-parallelen Teilen der Gewebeprobe und zum anderen aus einem Zerklei-25 nerungsgerät zur weiteren Aufarbeitung der mit dem Schneidapparat hergestellten Gewebesegmente. Bei den in diesen Vorrichtungen durchgeführten Schneidvorgängen werden die jeweiligen Gewebestücke und -flüssigkeiten, die von verschiedenen Stellen der heterogenen Gewebeprobe 30 stammen, voneinander getrennt in der Vorrichtung gehalten und können somit selektiv für die Zellvermehrung eingesetzt werden.

Der Schneidapparat umfaßt im wesentlichen eine in Kammern eingeteilte Auffangschale mit einer auf dieser beweglich angebrachten Schneidplatte sowie einen Schneidmesserrahmen. In der Schneidplatte in vorgegebenen Abständen ausgebildete Schneidrinnen, die im Schneidbereich zur Auffangschale hin offen sind, liegen jeweils oberhalb einer Kammer. Im Schneidmesserrahmen sind Schneidmesser oder Schneiddrähte in einem Abstand angebracht, der mit dem zwischen den Schneidrinnen übereinstimmt. Durch das Schneiden der auf der Schneidplatte liegenden Gewebeprobe jeweils im Bereich einer Schneidrinne wird ein sauberes

7

PCT/DE00/00528

Abtrennen der Gewebesegmente erreicht, und gleichzeitig gelangen Reststücke und Gewebeflüssigkeit in die unter-

halb der Schneidrinne liegende Kammer.

15

35

10

5

WO 00/53728

Zur weiteren Aufbereitung der Gewebesegmente ist ein Zerkleinerungsgerät vorgesehen, das aus einer in Kammern geteilten Flüssigkeits-Auffangschale, einer auf dieser lösbar angebrachten Aufbereitungsplatte mit Vertiefungen zur 20 Aufnahme der Gewebesegmente und einzelnen oder in einer Halteplatte drehbar und längsbeweglich angeordneten Drehstempeln mit an deren Stirnseite befestigten Messern besteht. Mit diesem Gerät werden die zur Zellvermehrung letztlich eingesetzten kleinen Gewebefragmente erzeugt. 25 Die gleichfalls verwendbare, bei dem Schneidvorgang entstehende Gewebeflüssigkeit gelangt über in den Vertiefungen ausgebildete Löcher in die jeweils darunterliegende Kammer in der Flüssigkeits-Auffangschale und wird ebenfalls zur Zellvermehrung verwendet. 30

Weitere Merkmale und vorteilhafte Weiterbildungen der erfindungsgemäßen Vorrichtung ergeben sich aus den übrigen Unteransprüchen.

Ein Ausführungsbeispiel der Erfindung wird nachfolgend beschrieben, wobei hinsichtlich der Zellvermehrung in vitro auf die beigefügte Tabelle, in der die Zusammensetzung des verwendeten Zellkulturmediums wiedergegeben ist, und hinsichtlich der Aufarbeitung der Gewebeproben auf die beigefügte Zeichnung Bezug genommen wird. In der Zeichnung zeigen:

10

Fig. 1

eine auseinandergezogene perspektivische Ansicht einer Schneidvorrichtung zur erfindungsgemäßen sequentiellparallelen Aufbereitung einer Gewebeprobe;

15

20

Fig. 2

eine auseinandergezogene perspektivische Darstellung einer Vorrichtung zur weiteren Aufbereitung der in der Vorrichtung nach Fig. 1 hergestellten Gewebesegmente für die Zellvermehrung in vitro;

Fig. 3

eine Schnittansicht einer Auffangschale längs der Linie B-B in Fig. 1;

25

Fig. 4

einen senkrechten Schnitt durch eine Schneidplatte im Bereich einer Schneidrinne längs der Linie A-A in Figur 1; und

30

Fig. 5

eine Querschnittsansicht der Vorrichtung nach Fig. 2 in zusammengebautem Zustand.

Die vom Patienten in Form einer Feinnadel-bzw. Stanz-Biopsie entnommene Gewebeprobe liegt als Gewebestanzzylinder vor, kann aber auch ein nach anderen Verfahren gewonnenes kleines Gewebefragment oder ein Gewebestück unterschiedlicher Form und Größe sein. Die Gewebeprobe mit den an dieser haftenden, von der Entnahmestelle der Probe am Patienten stammenden Erythrozyten wird für den Transport zum Untersuchungsort in einem Zellkulturmedium bei Temperaturen zwischen 2°C und 12°C aufbewahrt, und zwar für einen Zeitraum von mindestens 2 Stunden, maximal jedoch 24 Stunden. In diesem Zeitraum werden mechanische Belastungen des Gewebestücks vermieden. Das Gewebestück kann sich dabei bereits an das auch zur Zellvermehrung später benutzte Zellkulturmedium mit gleicher Zusammensetzung anpassen, wobei die oben angegebenen Temperaturen besonders günstig sind.

5

10

15

Die Aufarbeitung der Gewebeprobe für die Zellkultivierung erfolgt mit den in der Zeichnung dargestellten Vorrichtungen.

Die Vorrichtung zum sequentiell-parallelen Teilen der Gewebeprobe in Abschnitte von bestimmter, vorgegebener Län-25 ge und zum Separieren dieser Abschnitte bzw. von Bestandteilen derselben umfaßt eine Auffangschale 1, eine auf der Auffangschale 1 gehaltene Schneidplatte 2 und einen Schneidmesserrahmen 3. Die Schneidplatte 2 ist in fünf Abschnitte gleicher Breite eingeteilt. In jedem Abschnitt 30 befinden sich jeweils in unterschiedlichem Abstand angeordnete Schneidrinnen 4, die in ihrem mittleren Bereich zur Auffangsschale 1 hin offen sind. Die Schneidrinnen 4 sind in den fünf Abschnitten jeweils im Abstand von 1 mm, 2 mm, 3 mm, 5 mm und 1 mm angeordnet. In Längsrichtung 35 der Schneidplatte ist in deren mittlerem Bereich eine

aufgerauhte Auflagefläche 5 ausgebildet, um die darauf liegende Gewebeprobe 6 bei einem Schneidvorgang zu fixieren. In diesem Bereich sind die Schneidrinnen 4 nach unten offen. Die Schneidplatte 2 ist in zwei an den Längsseiten der Auffangschale 1 angebrachten Führungsschienen 7 verschiebbar gehalten. Die Schneidrinnen 4 in der Schneidplatte 2 setzen sich in Einschnitten 8 in den Führungsschienen fort.

10

PCT/DE00/00528

10

15

20

5

WO 00/53728

Die Auffangschale 1 ist entsprechend den in der Schneidplatte 2 vorgesehenen Rinnenabschnitten durch Trennwände 12 in fünf Kammern 1a – 1e geteilt, wobei den Schneidrinnen durch weitere Zwischenwände in den betreffenden Kammern 1a, 1b, 1c und 1e jeweils Unterkammern 1al bis 1a9, 1b1 bis 1b4, 1c1 bis 1c3 und 1e1 bis 1e9 zugeordnet sind. Die Unterkammern sind zur exakten örtlichen Zuordnung der einzelnen Gewebeprobesegmente 6a oder Gewebeprobenreste bzw. Gewebeflüssigkeit entsprechend unterschiedlich markiert.

Der Schneidmesserrahmen 3 besteht aus einem Deckel oder Halterahmen mit an dessen Deckplatte befestigten Schneidmessern 10. Anstelle der Schneidmesser 10 können zwischen 25 den Rahmenseiten auch Schneiddrähte gespannt sein. Die Schneidmesser 10 sind im gleichen Abstand wie die Schneidrinnen 4 in der Schneidplatte angeordnet. Der Schneidmesserrahmen 3 ist so dimensioniert bzw. die Schneidmesser 10 sind so angeordnet, daß die Schneidele-30 mente über bzw. in den Schneidrinnen 4 und Einschnitten 8 hin- und herbewegt werden können. Der Schneidmesserrahmen 3 kann an einer Längsseite der Auffangschale 1 gelenkig befestigt sein, und zwar so, daß er in der auf der Schneidplatte 2 befindlichen Lage dennoch quer zur Gewe-35

beprobe bewegt werden kann, um die Probe an den Schnittstellen sauber zu durchtrennen.

In Abhängigkeit von der Länge der Gewebeprobe und dem ge-5 wünschten Schnittabstand wird die Gewebeprobe 6 auf die aufgerauhte Auflage 5 der Schneidplatte 2 gelegt. Durch Hin- und Herbewegen des auf die Gewebeprobe gelegten (geklappten) Schneidmesserrahmens 3 wird das Präparat im Bereich der Schneidrinnen 4 durchtrennt. Beim Schneiden 10 entstehende Flüssigkeit fließt über die im Bereich der Auflagefläche 5 der Schneidplatte 2 in den Schneidrinnen 4 vorgesehenen Öffnungen 4a in die jeweils darunter liegende Unterkammer. Die aufgefangene Flüssigkeit kann ebenso für die Zellvermehrung genutzt werden wie die ab-15 getrennten Probensegmente, die entweder auf der Schneidplatte 2 liegenbleiben oder durch die Öffnung 4a in der Schneidrinne 4 in die darunterliegende Unterkammer fallen.

20

25

30

35

Mit der beschriebenen Vorrichtung gemäß den Figuren 1,3 und 4 können in den vorgegebenen Abmessungen präzise und gleichmäßige sowie glatte Schnitte ohne Beschädigung des Probenmaterials reproduzierbar ausgeführt werden. Die Zellvermehrung erfolgt somit aus einer entsprechend der Heterogenität des dem Patienten entnommenen Gewebestücks durch die Segmentierung örtlich aufgelösten Gewebeprobe. Dadurch wird der störende Einfluß von Normalzellen und Kontaminanten auf das Wachstum der Tumorzellen zurückgedrängt bzw. ausgeschaltet (Selektion). Außerdem kann auch die beim Schneiden der Gewebeprobe ortsaufgelöst entstehende Gewebeflüssigkeit, die wichtige Stammzellen enthält, für die Zellvermehrung genutzt werden. Im Ergebnis der sich an die unten beschriebene weitere Aufbereitung der Gewebeprobe anschließenden Zellvermehrung in vitro

können Aussagen über die Struktur der heterogen ausgebildeten Gewebeprobe, über die Anordnung des Tumorkerns oder die Malignität getroffen werden. Schließlich ist die Herstellung der Probensegmente mit der jeweiligen Ortsauflösung auch reproduzierbar, so daß verläßliche Aussagen über den Verlauf der Erkrankung oder die Wirkung therapeutischer Maßnahmen getroffen werden können.

12

PCT/DE00/00528

WO 00/53728

5

In einer Ausführungsvariante der oben beschriebenen Schneidvorrichtung kann das Durchtrennen der Gewebeprobe auch mit einem separaten Messerstempel (nicht dargestellt) erfolgen, an dem die Schneidmesser oder Schneiddrähte in einem Abstand angebracht sind, der mit dem zwischen den Schneidrinnen 4 übereinstimmt.

In den Figuren 2 und 5 ist eine Vorichtung zur weiteren Aufbereitung der ortsaufgelöst zur Verfügung gestellten Probensegmente 6a oder von Reststücken wiedergegeben. Bei 20 dieser Vorrichtung ist eine Flüssigkeits-Auffangschale 13 durch senkrechte Trennwände 11 in mehrere Kammern 13a bis 13e aufgeteilt. In zwei am oberen Rand der Flüssigkeits-Auffangschale 13 gegenüberliegend angebrachten Führungsschienen 14 ist eine Aufbereitungsplatte 15 mit in dieser 25 im Abstand eingeformten Vertiefungen 16 gehalten. Die Vertiefungen 16 weisen am Boden kleine Löcher 17 auf. In der in die Führungsschienen 14 vollständig eingeschobenen Lage der Aufbereitungsplatte 15 liegen die Vertiefungen 30 16 jeweils über einer Kammer 13a bis 13e. Die zuvor abgetrennten Probensegmente 6a der Gewebeprobe 6 werden in die Vertiefungen 16 gelegt und mit an einem Drehstempel 18 befestigten Drehstempelmesser 19 weiter zerkleinert. Vorzugsweise sind 2 oder mehrere Drehstempelmesser 19 an 35 der Stirnseite des Drehstempels angeordnet. Das Zerkleinern der Probensegmente 6a erfolgt bei leichtem Druck und

gegebenenfalls gleichzeitigem Hin- und Herdrehen des Drehstempels 18.

Wie Fig. 2 zeigt, können auch mehrere Drehstempel 18 in einer Halteplatte 20 drehbeweglich und heb- und senkbar gehalten sein. Der Abstand zwischen den Drehstempeln 18 entspricht dem der Vertiefungen 16 in der Aufbereitungsplatte 15.

10

15

Nach der weiteren Teilung der Probensegmente 6a stehen deren Teilstücke (Gewebefragmente) und die bei diesem Trennvorgang entstehende Gewebeflüssigkeit, die über die Löcher 17 in den Vertiefungen 16 in die Kammern 13a bis 13e gelangt, für die Zellvermehrung zur Verfügung.

Die in den Figuren 1 bis 5 dargestellten Vorrichtungen
zum ortsaufgelösten, sequentiell-parallelen Schneiden und
weiteren Aufbereiten der Gewebeprobe bestehen aus einem
bis 121°C beständigen, zur Behandlung im Autoklav geeigneten Material, vorzugsweise Teflon, Metall oder Plastik.
Für die Schneidmesser wird vorzugsweise Glas verwendet.

25

30

35

Die einzelnen Teilstücke und die jeweilige Gewebeflüssigkeit der ortsaufgelöst hergestellten Probensegmente 6a
werden nun separat in einzelne, mit dem gleichen Zellkulturmedium, in dem sich bereits die dem Patienten entnommene Gewebeprobe 6 befand, gefüllte Zellkulturflaschen
eingebracht. Das verbleibende Zellkulturmedium, in dem
die Gewebeprobe nach der Probenahme aufbewahrt wurde,
wird ebenfalls in eine Zellkulturflasche gefüllt. Die
Zellkulturflaschen sind jeweils mit einer Biomatrix, hier
Collagen oder Polylysin beschichtet. Die Zusammensetzung

des hier für die Zellvermehrung in vitro eingesetzten Zellkulturmediums ist in der nachfolgenden Tabelle wiedergegeben:

#### 5 Anorganische Salze

		— <del>-</del>
	$Ca(NO_3)_2$	50 mg/L
	$CaCl_2 \bullet 2 H_2O$	132 mg/L
	Kcl	400 mg/L
	$MgSO_4 \bullet 7 H_2O$	150 mg/L
10	NaCl	6400 mg/L
	NaHCO <sub>3</sub>	2100 mg/L
	$Na_2HPO_4$	400 mg/L
		<i>37</i> —

#### 15 Aminosäuren

	L-Arginin • 4 HCl	110 mg/L
	L-Asparagin (freie Base)	38 mg/L
	L-Asparaginsäure	23 mg/L
	L-Cystin	31 mg/L
20	L-Glutaminsäure	25 mg/L
	L-Glutamin	296 mg/L
	Glycin	13 mg/L
	L-Histidin (freie Base)	12 mg/L
	L-Hydroxyprolin	10 mg/L
25	L-Isoleucin	38 mg/L
	L-Leucin	38 mg/L
	L-Lysin • HCl	35 mg/L
	L-Methionin	12 mg/L
	L-Phenylalanin	16 mg/L
30	L-Prolin	22 mg/L
	L-Serin	26 mg/L
	L-Threonin	22 mg/L
	L-Tryptophan	5 mg/L
	L-Tyrosin	19 mg/L
35	L-Valin	22 mg/L
	L-Alanin	10 mg/L
		<b>→</b> · · · · ·

### Vitamine

	Biotin	0,6 mg/L
	D-Ca-Pantothenat	0,7  mg/L
5	Cholinchlorid	3,5 mg/L
	Folsäure	1,0 mg/L
	i-Inositol	35,9 mg/L
	Nicotinamid	1,0 mg/L
	Pyridoxal • HCl	1,0 mg/L
10	Riboflavin	20 μg/L
	Thiamin • HCl	1,0 mg/L
	Para-Aminobenzoesäuure	500 μg/L
	Vitamin B <sub>12</sub>	5 μg/L
	Niacin	25 μg/L
15	Ascorbinsäure	50 μg/L
	Folinsäure	6 μg/L
	Liponsäure	21 μg/L
	Vitamin A (Acetat)	100 μg/L
	Pyridoxin • HCl	25 μg/L
20	Niacinamid	25 μg/L
	lpha-Tocopherolphosphat	10 μg/L
		10 μg/L

### Weitere Komponenten

25	D-Glucose	1750 . /-	
	Phenolrot	1750 mg/L	
		7  mg/L	
	Glutathion (reduziert)	0,5  mg/L	
	Na-Pyrovat	1 mM	
	Enidowell		

Epidermaler Wachstumsfaktor

30 (Epidermal Growth Factor, EGF-rekombinant 250 ng/L Fötales Rinderserum (FBS) 12,5 %

Insulin vom Rind (Lyophilisat)8 mg/L (26 U/mg)

35 Antibiotika nach Stand der Technik.

Die mit einer Biomatrix beschichteten Zellkulturflaschen mit dem erfindungsgemäßen Zellkulturmedium und den in diesem befindlichen, nach dem zuvor beschriebenen Aufbereitungsverfahren hergestellten kleinen Gewebefragmenten bzw. der Gewebeflüssigkeit werden anschließend in einen Brutschrank eingebracht und dort bei einer Temperatur zwischen 30°C und 36,5°C, einer Sauerstoffatmosphäre von 0,01 bis 3 %, einer Kohlendioxidatmosphäre von 0,1 bis 5 % und einer Luftfeuchte von 100 % aufbewahrt. Die genaue

Temperatur richtet sich nach der Temperatur, die bei der

Entnahme der Gewebeprobe gemessen wurde.

16

PCT/DE00/00528

WO 00/53728

5

- Bereits nach 1 bis 12 Stunden erfolgt eine Adhäsion der Tumorzellen an das Biomatrixsubstrat in der Zellkulturflasche. Etwa 24 Stunden nach der Erstetablierung der Kultur wird nach erfolgter Zelladhäsion das in den Zellkulturflaschen befindliche Medium gegen ein frisches Zellkulturmedium, das die gleiche Zusammensetzung wie das erste aufweist, ausgetauscht. Weitere Medienwechsel werden je nach Präsenz von Kontaminanten in der ersten Woche durchgeführt. Nachdem die Tumorzellen nach einer Ruhephase etabliert sind und sich vermehren, werden sie in einem von Antibiotika freien Medium gehalten. Daraufhin wird die Massenvermehrung initiiert.
- Durch die oben beschriebene frühzeitige Teilung der Gewe30 beprobe nach 2 bis 24 Stunden in separate Gewebesegmente
  bzw. noch kleinere Gewebefragmente ist die Wahrscheinlichkeit einer Kontamination und einer Massenvermehrung
  von Kontaminanten in den Kulturflaschen gering. Dennoch
  vereinzelt aufgefundene Kulturflaschen mit hoher Kontaminationsbelastung werden verworfen. Bei einer durch technische Fehler bedingten starken Vermehrung von Normalzel-

len, die zu einem Überwachsen der Tumorzellen führen, kann auch eine Magnetseparation durchgeführt werden, woraufhin unter den oben angegebenen Kulturbedingungen ein selektives Wachstum der malignen Zellen gewährleistet ist.

10

WO 00/53728

# Bezugszeichenliste

5	1	
J	_	Auffangschale
	lal bis la10	Unterkammern
	lbl bis 1b5	Unterkammern
	1cl bis 1c3	Unterkammern
	1d	
10	lel bis le10	Unterkammern
	2	Schneidplatte
	3	Schneidmesserrahmen
	4	Schneidrinnen
	4 a	Öffnung in 4
15	5	Auflagefläche
	6	Gewebeprobe
	6a	Probensegment
	7	Führungsschiene
	8	Einschnitte
20	10	Schneidmesser/Schneiddrähte
	11	Trennwand
	12	Trennwand
	13	Flüssigkeitsauffangschale
	13a bis 13e	Kammern
25	14	Führungsschienen
	15	Aufbereitungsplatte
	16	Vertiefungen
	17	Löcher
	18	Drehstempel
30	19	Drehstempelmesser
	20	Drehstempel-Halteplatte
		marcabracce

19

### Patentansprüche

5

10

- 1. Verfahren zur Kultivierung von Krebszellen aus Humangewebe für molekularbiologische Reihenuntersuchungen, dadurch gekennzeichnet, daß eine Gewebeprobe (6) auf der Grundlage ihrer heterogenen Struktur in bezug auf Tumorzellen, Normalzellen und Kontaminanten durch eine sequentiell-parallele Teilung in Scheibensegmente örtlich aufgelöst wird und die einzelnen Gewebeprobensegmente separiert und weiter in Gewebefragmente geteilt werden und die gewonnenen kleinen, separierten Gewebefragmente und Gewebeflüssigkeiten der ortsaufgelösten Gewebeprobensegmente (6a) in einem bestimmten Zellkulturmedium unter vorgegebenen Kulturbedingungen selektiv zum Wachstum gebracht werden.
- Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Gewebeprobe aus Feinnadel-, Aspirations- und intraoperativem Biopsien oder einer Resektatprobe gewonnen wird und zusammen mit den an der Gewebeprobe haftenden Erythrozyten aus dem Bereich der Entnahmestelle der Probe an dem betreffenden Patienten vorübergehend in ein Zellkulturmedium eingebacht wird.
- 3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet,
  daß das Zellkulturmedium zur zwischenzeitlichen Aufbewahrung der frischen Gewebeprobe mit dem Vermehrung der Tumorzellen vorgesehenen Zellkulturmedium identisch ist.



5

30

- 4. Verfahren nach Anspruch 2 und 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Gewebeprobe (6) zur Anpassung an das Zellkulturmedium in diesem mindestens 2 Stunden, jedoch nicht länger als 24 Stunden bei einer Temperatur zwischen 4°C und 12°C verbleibt.
- 5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die aus den ortsaufgelösten Gewebeprobensegmenten(6a) erzeugten Gewebefragmente und flüssigkeiten separat in mit einer Biomatrix beschichteten und mit dem Zellkulturmedium gefüllten Zellkulturflaschen unter einer Sauerstoffatmosphäre von 0,01 bis 3 % und einer Kohlendioxidatmosphäre von 0,1 5 % sowie bei einer Luftfeuchte von 100 % und Temperaturen zwischen 30°C und 36,5°C kultiviert werden.
- Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß eine bestimmte Zeit nach der Erstetablierung der Kultur und erfolgter Zelladhäsion das Zellkulturmedium in der Kulturflasche gegen ein neues, jedoch mit gleicher Zusammensetzung ausgetauscht wird.
  - 7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Zellkulturmedium in Abhängigkeit von der Präsenz von Kontaminanten, wie Bakterien oder Pilze, bei gleichbleibendem oder verringertem Anteil an Antibiotika ausgetauscht wird.
- 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Zellkulturmedium aus anorganischen Salzen, nämlich

	$Ca(NO_3)_2$ $CaCl_2 \circ 2H_2O$ $Kcl$	10-100 80-150 200-1000	mg/L mg/L
5	$MgSO_4 \circ 7H_2O$	200-700	mg/L
	NaCl	3000-100	
	NaHCO <sub>3</sub>	1500-400	
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	100-1000	_
10			
	Aminosäuren, nämlich		
	L-Arginin • 4 HCl	10-500	mg/L
	L-Asparagin (freie Base)	10-500	mg/L
15	L-Asparaginsäure	10-500	mg/L
	L-Cystin	10-500	mg/L
	L-Glutaminsäure	10-500	mg/L
3	L-Glutamin	10-500	mg/L
	Glycin	10-500	mg/L
20	L-Histidin (freie Base)	10-500	mg/L
	L-Hydroxyprolin	10-500	mg/L
	L-Isoleucin	10-500	mg/L
	L-Leucin	10-500	mg/L
	L-Lysin • HCL	10-500	mg/L
25	L-Methionin	10-500	mg/L
	L-Phenylalanin	10-500	mg/L
	L-Prolin	10-500	mg/L
	L-Serin	10-500	mg/L
	L-Threonin	10-500	mg/L
30	L-Tryptophan	10-400	mg/L
	L-Tyrosin	10-500	mg/L
	L-Valin	10-500	mg/L
	L-Alanin	10-300	mg/L
35	Vitaminen, nämlich		

	^
٠,	٠,
_	

	2	22	
	Biotin	0,01-10	mg/L
	D-Ca-Pantothenat	0,01-10	mg/L
	Cholinchlorid	0,1-50	mg/L
	Folsäure	0,01-10	mg/L
5	i-Inositol	0,1-100	mg/L
	Nicotinamid	0,01-10	mg/L
	Pyridoxal • HCL	0,01-10	mg/L
	Riboflavin	0,1-100	μg/L
	Thiamin o HCL	0,1-50	mg/L
10	Para-Aminobenzoesäure	1-1000	μg/L
	Vitamin B <sub>12</sub>	1-1000	μg/L
	Niacin	1-100	μg/L
	Ascorbinsäure	1-5000	μg/L
	Folinsäure	1-100	μg/L
15	Liponsäure	1-100	μg/L
	Vitamin A (Acetat)	10-1000	μg/L
	Pyridoxin • HCl	1-100	μg/L
	Niacinamid	1-100	μg/L
	lpha-Tocopherolphosphat	0-1000	μg/L
20			, ,
	sowie		
	D-Glucose	100-5000	mg/L
	Phenolrot	0,1-1000	mg/L
25	Glutathion (reduziert)	0,01-10	mg/L
	Na-Pyruvat	0,1-50	nM
	Epidermaler Wachstumsfak		
	(Epidermal Growth Factor	EGF)	
	-rekombinant	1-3000	ng/L
30	Fötales Rinderserum (FE	BS)	<b>J</b> . –
	Insulin vom Rind (Lyophi	lisat) 0,1-	-50 mg/L
	und Antibiotika zusammen	acactat :	_

und Antibiotika zusammengesetzt ist.

23

Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1, zur ortsaufgelösten Aufbereitung der Gewebeprobe, gekennzeichnet durch einen Schneidapparat zum sequentiell-parallelen Zerteilen der Gewebeprobe (6) in einzelne, voneinander getrennte Gewebesegmente 5 (6a) und der entsprechenden Schnittstelle zugehöriger Gewebeflüssigkeit, bestehend aus einer in Kammern mit Unterkammern (la1 bis 1a10, 1b1 bis 1b5, 1c1 bis 1c3, 1d und 1e1 bis 1e10) aufgeteilten Auffangschale (1), einer auf dieser lösbar gehaltenen Schneidplatte (2) 10 mit zur Auffangschale (1) hin teilweise offenen Schneidrinnen (4) sowie einem Schneidmesserrahmen (3) für Schneidmesser (10), wobei die Anordnung der Schneidmesser (10) im Schneidmesserrahmen (3) mit der der Schneidrinnen (4) in der Schneidplatte (2) über-15 einstimmt und jeder Schneidrinne (4) eine sich unter dieser befindenden einzelnen Unterkammer zugeordnet ist; sowie ein Zerkleinerungsgerät zur weiteren Aufbereitung der ortsaufgelösten Gewebeprobensegmente (6a), die eine in Kammern (13a bis 13e) aufgeteilte 20 Flüssigkeits-Auffangschale (13), eine auf dieser lösbar angebrachte Aufbereitungsplatte (15) mit Vertiefungen (16) sowie Drehstempel (18) mit Drehstempelmessern (19) umfaßt, wobei die Vertiefungen (16) Löcher (17) aufweisen und sich jeweils oberhalb einer 25 Kammer (13a bis 13e) befinden und die Drehstempel (18) den Vertiefungen (16) zugeordnet sind.

10. Vorrichtung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Schneidplatte (2) eine senkrecht zu den Schneidrinnen (4) verlaufende und mittig angeordnete aufgerauhte Auflagefläche (5) zur stabilen Lagerung der Gewebeprobe (6) aufweist.

24

- 11. Vorrichtung nach Anspruch 9 und 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Schneidrinnen (4) im Bereich der Auflagefläche (5) zu der darunterliegenden Unterkammer hin offen sind, so daß beim Schneiden gebildete Gewebeflüssigkeit oder Gewebestücke getrennt in der jeweiligen Unterkammer aufgefangen werden.
- 12. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Breite der Schneidrinnen (4) größer als die Stärke der Schneidmesser (10)
  ist.

5

20

25

30

35

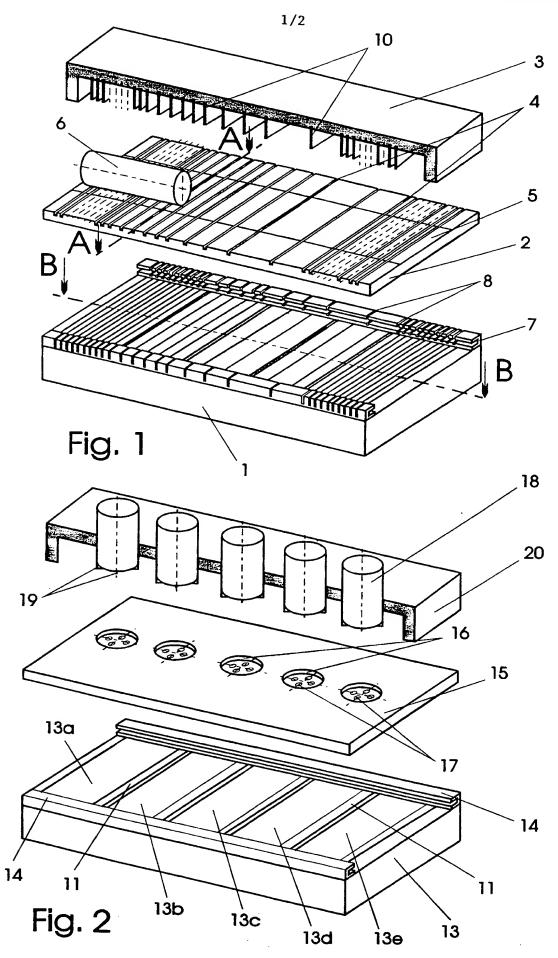
13. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Schneidmesser (10) an einer Deckplatte des Schneidmesserrahmens (3) befestigt sind.

14. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Schneidmesser (10) in dem Schneidmesserrahmen (3) verspannte Schneiddrähte bilden.

15. Vorrichtung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Schneidplatte (2) und die Aufbereitungsplatte (15) jeweils in Führungsschienen (7 bzw. 14) an der Auffangsschale (1) bzw. der Flüssigkeits-Auffangschale (13) gehalten sind, wobei in den Führungsschienen (7) für die Schneidplatte (2) mit den Schneidrinnen (4) fluchtende Einschnitte (8) ausgebildet sind.

16. Vorrichtung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Drehstempel (18) in Bohrungen einer Drehstempel-Halteplatte (20) in senkrechter Richtung bewegbar sowie drehbar angeordnet sind.

		,
		ı



		,
		,s
		. •
		ŧ

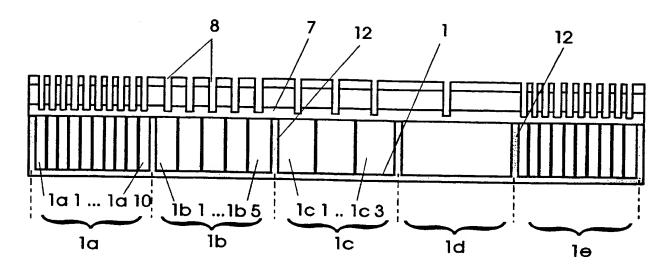
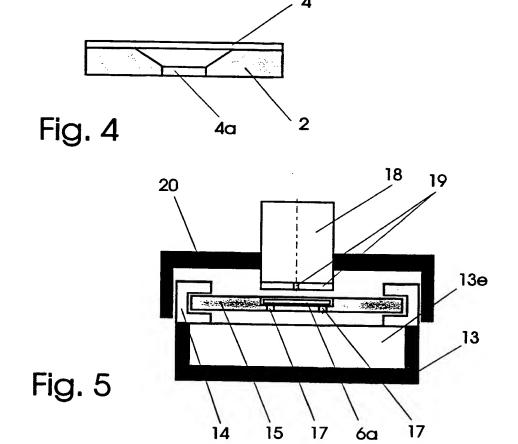


Fig. 3



			<b>&gt;</b>
			· }
•			
	÷.		
			÷

1600

1214.00026 PATENT JC05 Rec'd PCTITTO 27 FEB 2002

### IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

n re Application of:	)	1645	되
ANDREAS JORDAN	)	METHOD FOR CULTIVATING CANCER CELLS FROM HUMAN	CENTER
Corres. to PCT/DE00/00528	)	TISSUE AND DEVICE FOR PREPARING TISSUE SAMPLES	ER 16
Serial No. 09/914,662	)		1600/2900
Filed August 31, 2001	)		ŏ

TRANSMITTAL LETTER

Box PCT Commissioner for Patents Washington, D.C. 20231

Sir:

Enclosed in connection with the above case is an English translation of the International Preliminary Examination Report.

Respectfully submitted,

WOOD, PHILLIPS, VAN SANTEN, CLARK & MORTIMER

Ву

effrey L. Clark

February 7, 2002

500 West Madison Street Suite 3800 Chicago, IL 60661-2511 (312) 876-1800

37 CFR 1.8 CERTIFICATE OF MAILING

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as first class mail in an envelope addressed to: Box PCT, Commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231, on February 7, 2002.

Signature: Run Sundum

Karen Sanderson

PCT INITIAL PROCESSING
HAR-1 2002
RECEIVED

# . PATENT COOPERATION TREATY



# **PCT**

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference		SeeNotifica	tionofTransmittalofInternational Preliminary
GES-15 559 WO	FOR FURTHER ACTIO	N Examination	n Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No.	International filing date (da		Priority date (day/month/year) 10 March 1999 (10.03.99)
PCT/DE00/00528	18 February 2000 (		10 March 1999 (10.03.99)
International Patent Classification (IPC) or n	ational classification and IPC	;	',
<u> </u>			
	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·		
Applicant	JORDAN, An	dreas	
and is transmitted to the applicant a	ccording to Article 36.		national Preliminary Examining Authority
<ol><li>This REPORT consists of a total of</li></ol>	6 sheets, included	iding this cover	sheet.
amended and are the basis for	nied by ANNEXES, i.e., sheet or this report and/or sheets contents: Administrative Instructions	ntaining rectific	ion, claims and/or drawings which have been ations made before this Authority (see Rule
These annexes consist of a to	otal of 8 sheet	s.	1
This report contains indications relations.	ating to the following items:		
I Basis of the report			
II Priority		•	
III Non-establishment	of opinion with regard to no	elty, inventive s	step and industrial applicability
IV Lack of unity of in			
v Reasoned statemer citations and expla	nt under Article 35(2) with reparting such state	gard to novelty, i ment	inventive step or industrial applicability;
VI Certain documents	cited		
VII Certain defects in	the international application		
VIII Certain observatio	ns on the international applic	ation	
Date of submission of the demand	Di	ate of completion	of this report
18 September 2000 (1		-	8 June 2001 (08.06.2001)
Name and mailing address of the IPEA/E	P A	uthorized officer	
Facsimile No.	T	elephone No.	

Form PCT/IPEA/409 (cover sheet) (July 1998)

International application No.

### PCT/DE00/00528

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

		of the report
1.	With	egard to the elements of the international application:*
[		the internati nal application as originally filed
į	$\overline{\mathbf{X}}$	the description:
•		pages 1-18 , as originally filed
		pages, filed with the demand
		pages, filed with the letter of
1	$\nabla$	the claims:
•		pages, as originally filed
		pages, as amended (together with any statement under Article 19
		pages , filed with the demand
		pages 1-16 , filed with the letter of 02 March 2001 (02.03.2001)
ı	K-71	
ļ	$\boxtimes$	the drawings:  1/2 , as originally filed
		filed with the demand
		pages 02 March 2001 (02.03.2001)
	∐ t	he sequence listing part of the description:
		pages, as originally filed
		pages, filed with the demand
		pages, filed with the letter of
	the ir	regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which itemational application was filed, unless otherwise indicated under this item.  e elements were available or furnished to this Authority in the following language which is:  the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).  the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).  the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).
3.	With preli	regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international minary examination was carried out on the basis of the sequence listing:  contained in the international application in written form.  filed together with the international application in computer readable form.  furnished subsequently to this Authority in written form.
	Щ	furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
	لـا	The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
		The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.
4.		The amendments have resulted in the cancellation of:  the description, pages the claims, Nos the drawings, sheets/fig
5.		This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**
	in to	lacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to his report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 70.17).
	* Any	replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE 00/00528

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

Statement			
Novelty (N)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-16	YES
Inventive step (15)	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1, 8-16	YES
Zione d'Americani	Claims	2-7 (see Box VIII, item 2)	NO

### 2. Citations and explanations

The present claims can be acknowledged to be novel because the available prior art does not mention the sequential-parallel division of a tissue sample into disk-shaped segments. An inventive step also appears to be established because the available prior art does not propose dividing and at the same time separating the divided, that is to say broken-up, tissue fragments in order to prevent normal cells, which are also present, from overgrowing the tumour cells.

Consequently, the present Claims 1-7 meet the requirements of PCT Article 33(2) and (3). The same applies to claims 8-16, whose subject matter is also not described or suggested by the available prior art.

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/DE 00/00528

VII (	Certain	defects	in the	international	application
-------	---------	---------	--------	---------------	-------------

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

No basis can be found in the original application documents for the amendments to the newly filed Claims 1 and 2.

: :

: v

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

- According to the present description (see page 1, 1. last paragraph), the cell culture media used until now in the prior art are not suitable for promoting the growth of cancer cells. Consequently, the use of the claimed cell culture medium (see page 13, last paragraph to page 15 of the application) appears to be necessary in order to successfully carry out the claimed method for cultivating cancer cells. In this respect, the applicant is invited to note that all the features that are essential for carrying out an invention must be defined in the independent claims. Moreover, the method parameters indicated on page 16, first paragraph, appear to be essential for carrying out the claimed method, that is for promoting the growth of cancer cells and suppressing the growth of normal cells and contaminants. Consequently, these features should also be included in the independent claims.
- Claim 2, and hence also Claims 3-7, which refer back to Claim 2, concern a surgical method. Consequently, these claims concern a subject matter which, in the opinion of the Examiner, falls under PCT Rule 67.1(iv). As a result, no opinion is established with regard to the industrial applicability of the subject matter of these claims (PCT Article 34(4)(a)(i)).
- 3. The wording of Claim 1 is unclear: Claim 1 states that sequential-parallel <u>separation</u> is carried out, but leads to the <u>breaking-up</u> of the tissue sample?!

÷ - -. 

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No. PCT/DE 00/00528

### VIII. Certain observations n the internati nal application

Moreover, the expression "sequential-parallel" does not appear to be a standard technical term. This is also true of the expression "spatially resolved". Consequently, the use of these expressions leads to an objection for lack of clarity (PCT Article 6). It might be better to replace them by the expression "divided" ("aufgeteilt", in German) used on page 4 of the description.

• 



# **PCT**

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts	WEITERES siehe Mitteilung über G	lie Übermittlung des internationalen Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit
GES-15 559 WO	VORGEHEN zutreffend, nachsteher	nder Punkt 5
Internationales Aktenzeichen	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)
PCT/DE 00/00528	18/02/2000	10/03/1999
Anmelder		
JORDAN, Andreas		
Dieser internationale Recherchenbericht wurd Artikel 18 übermittelt. Eine Kople wird dem Int	le von der Internationalen Recherchenbehörde e ternationalen Büro übermittelt.	erstellt und wird dem Anmelder gemäß
Dieser internationale Recherchenbericht umfa  X Darüber hinaus liegt ihm jev	aßt insgesamt <u>3</u> Blätter. wells eine Kopie der in diesem Bericht genannte	n Unterlagen zum Stand der Technik bei.
A Daluber fillings negrillings		
1. Grundlage des Berichts		u de la la la des Coscobo
<ul> <li>a. Hinsichtlich der Sprache ist die inte durchgeführt worden, in der sie eing</li> </ul>	rnationale Recherche auf der Grundlage der int gereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nicht:	ernationalen Anmeldung in der Sprache s anderes angegeben ist.
Die Internationale Recherch Anmeldung (Regel 23.1 b))	ne ist auf der Grundlage einer bei der Behörde e durchgeführt worden.	ingereichten Übersetzung der internationalen
b. Hinsichtlich der in der internationale Recherche auf der Grundlage des S	en Anmeldung offenbarten <b>Nucleotid- und/ode</b> Sequenzprotokolis durchgeführt worden, das	r Aminosäuresequenz ist die internationale
	eldung in Schriflicher Form enthalten ist. onalen Anmeldung in computeriesbarer Form ei	ngereicht worden ist.
1 🗀	ch in schriftlicher Form eingereicht worden ist.	
1	ch in computerlesbarer Form eingereicht worder	ist.
Die Erklärung daß das nach	hträglich eingereichte schriftliche Sequenzproto im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgel	koll nicht über den Offenbarungsgehalt der ,
Die Erklärung, daß die In o wurde vorgelegt.	omputerlesbarer Form erfaßten Informationen d	em schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen,
2. Bestimmte Ansprüche ha	ben sich als nicht recherchierbar erwiesen (	siehe Feld I).
3. Mangelnde Einheitlichkei	t der Erfindung (siehe Feld II).	
4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfi	ndung	
X wird der vom Anmelder ein	gereichte Wortlaut genehmigt.	
wurde der Wortlaut von de	r Behörde wie folgt festgesetzt:	
5. Hinsichtlich der Zusammenfassung		
wurde der Wortlaut nach F Anmelder kann der Behörd Recherchenberichts eine S		Absending dieses internationalen
	n ist mit der Zusammenfassung zu veröffentliche	
wie vom Anmelder vorges		keine der Abb.
I	teine Abbildung vorgeschlagen hat.	
weil diese Abbildung die E	rfindung besser kennzeichnet.	

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT



Internationales Aktenzeichen 00/00528

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 C12N5/08 C12M3/04

G01N1/06

C12N5/06

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

### B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole ) IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ

Weltere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu

C. ALS WE	SENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN	
(ategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr, Anspruch Nr.
Ρ,Χ	DE 199 12 798 C (JORDAN ANDREAS) 17. Februar 2000 (2000-02-17) das ganze Dokument	1-16
A	WO 97 23602 A (NESTLE SA ;BAUR MARKUS (CH); MACE CATHERINE (CH); MALNOE ARMAND (C) 3. Juli 1997 (1997-07-03) Seite 15, Zeile 8-31; Beispiel 6  -/	1,5-8

enthemnen	
<ul> <li>Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen</li> <li>A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</li> <li>*E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen</li> </ul>	*T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
Anmeldedatum veröffentlicht worden ist  *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)  *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht  *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist	<ul> <li>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer T\u00e4tigkeit beruhend betrachtet werden</li> <li>"Y" Ver\u00f6fentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer T\u00e4tigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Ver\u00f6ffentlichung mit einer oder mehreren anderen Ver\u00f6ffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung f\u00fcr einen Fachmann naheliegend ist</li> <li>"\u00e4" Ver\u00f6ffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</li> </ul>
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
28. November 2000	07/12/2000
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter  Mateo Rosell, A.M.

Siehe Anhang Patentfamilie

2

entnehmen

• 

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT



ng) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN  Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht komme  IMAGAWA W ET AL: "SERUM-FREE GROWTH OF	enden Teile	Betr. Anspruch Nr.
	enden Lelle	Beir, Anspruch Nr.
TMACALIA II ET AL. "SEPLIM-EDEE CROUTH OF		
NORMAL AND TUMOR MOUSE MAMMARY EPITHELIAL CELLS IN PRIMARY CULTURE" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, Bd. 79, Nr. 13, 1982, Seiten 4074-4077, XP000965632 1982 ISSN: 0027-8424 das ganze Dokument		1,5-8
PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1995, no. 11, 26. Dezember 1995 (1995-12-26) & JP 07 218398 A (SEITAI KAGAKU KENKYUSHO:KK), 18. August 1995 (1995-08-18) Zusammenfassung		9,11
WO 95 24464 A (BAXTER INT ;UNIV NORTHWESTERN (US)) 14. September 1995 (1995-09-14) Zusammenfassung; Abbildungen 1,2		9,11
DE 43 34 281 A (DORNHAN MASCHF GMBH) 13. April 1995 (1995-04-13) Ansprüche 1,2; Abbildungen 1-3		9
US 5 985 290 A (LEVITSKY HYAM I ET AL) 16. November 1999 (1999-11-16) Seite 5, Zeile 15 -Seite 6, Zeile 19		1,5-8
	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, Bd. 79, Nr. 13, 1982, Seiten 4074-4077, XP000965632 1982 ISSN: 0027-8424 das ganze Dokument  PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1995, no. 11, 26. Dezember 1995 (1995-12-26) & JP 07 218398 A (SEITAI KAGAKU KENKYUSHO:KK), 18. August 1995 (1995-08-18) Zusammenfassung  WO 95 24464 A (BAXTER INT ;UNIV NORTHWESTERN (US)) 14. September 1995 (1995-09-14) Zusammenfassung; Abbildungen 1,2  DE 43 34 281 A (DORNHAN MASCHF GMBH) 13. April 1995 (1995-04-13) Ansprüche 1,2; Abbildungen 1-3  US 5 985 290 A (LEVITSKY HYAM I ET AL) 16. November 1999 (1999-11-16) Seite 5, Zeile 15 -Seite 6, Zeile 19	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, Bd. 79, Nr. 13, 1982, Seiten 4074-4077, XP000965632 1982 ISSN: 0027-8424 das ganze Dokument  PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1995, no. 11, 26. Dezember 1995 (1995-12-26) & JP 07 218398 A (SEITAI KAGAKU KENKYUSHO:KK), 18. August 1995 (1995-08-18) Zusammenfassung  WO 95 24464 A (BAXTER INT ;UNIV NORTHWESTERN (US)) 14. September 1995 (1995-09-14) Zusammenfassung; Abbildungen 1,2  DE 43 34 281 A (DORNHAN MASCHF GMBH) 13. April 1995 (1995-04-13) Ansprüche 1,2; Abbildungen 1-3  US 5 985 290 A (LEVITSKY HYAM I ET AL) 16. November 1999 (1999-11-16) Seite 5, Zeile 15 -Seite 6, Zeile 19

	•	
	•	
*		, £

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die elbe

elben Patentfamilie gehören

Im Recherchenberich geführtes Patentdokun	t nent	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
DE 19912798	С	17-02-2000	WO 0053728	A	14-09-2000
WO 9723602	A	03-07-1997	AU 1305497	Α	17-07-1997
NO 37E300E	• •		BR 9612256	Α	13-07-1999
			CZ 9801945	Α	11-11-1998
			EP 0780469	Α	25-06-1997
			EP 0877797	Α	18-11-1998
			HU 9903742	Α	28-03-2000
			JP 2000506374	T	30-05-2000
			NO 982810		21-08-1998
			PL 327320		07-12-1998
			SK 83598	Α	11-01-1999
JP 07218398	Α	18-08-1995	KEINE		
WO 9524464		14-09-1995	AU 687531	В	26-02-1998
NO JOETTO	••		AU 2060195	Α	25-09-1995
			CA 2162465	Α	14-09-1995
			EP 0698085	Α	28-02-1996
			IL 112944	Α	18-02-1997
			. JP 9501324	T	10-02-1997
			US 5512480	Α	30-04-1996
DE 4334281		13-04-1995	AT 186478	T	15-11-1999
DE 1001E01	••		DE 9321578	U	09-03-2000
			EP 0647475	Α	12-04-1995
US 5985290		16-11-1999	US 6033674	Α	07-03-2000
00 0000200			US 6087174		11-07-2000

•			•
			4
		*	
	<i>y</i> 1		
÷y			

# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS PCT INTERNATIONALE INTERNATIONALE PCT

(Artikal 36 und Regal 70 PCT)

			(Altikei 30 ulik	ı nege		1)	
Aktenzeic	hen de	s Anmelders oder Anwalts			siehe Mittei	lung über die Übersendung des internationale	 en
GES-15	559	WO	WEITERES VORG	SEHEN		Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internation	nales A	ktenzeichen	Internationales Anmeld	edatum <i>(Ta</i>	g/Monat/Jahr)	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag)	
PCT/DE	00/00	0528	18/02/2000			10/03/1999	
Internation C12N5/0		stentklassifikation (IPK) oder r	nationale Klassifikation ur	nd IPK			
Anmelder			·				
JORDAI	V, An	dreas					
1. Diese Behö	er inte	ernationale vorläufige Prüf rstellt und wird dem Anme	rungsbericht wurde vor elder gemäß Artikel 36	n der mit d übermitte	der internatio	nalen vorläufigen Prüfung beauftragten	
2. Diese	er BE	RICHT umfaßt insgesamt	6 Blätter einschließlic	h dieses	Deckblatts.		
t E	ınd/od Behöre	der Zeichnungen, die geär	ndert wurden und dies chtigungen (siehe Reg	em Berich	nt zugrunde l	ter mit Beschreibungen, Ansprüchen iegen, und/oder Blätter mit vor dieser : 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PC	:Т).
	_	<u> </u>	,		7		
3. Diese	er Ber	icht enthält Angaben zu fo	olgenden Punkten:				
		-					
	⊠ □	Grundlage des Berichts					
11		Priorität					
III IV				eit, erfinde	erische Tätig	keit und gewerbliche Anwendbarkeit	
V	⊠	Mangelnde Einheitlichke Begründete Feststellung gewerblichen Anwendba	nach Artikel 35(2) hin	sichtlich o	der Neuheit,	der erfinderischen Tätigkeit und der	
VI	×	Bestimmte angeführte U		Erkiarung	en zur Stutz	ung dieser Feststellung	
VII	$\boxtimes$	Bestimmte Mängel der in	_	una			
VIII	$\boxtimes$	Bestimmte Bemerkunger		_	a		
					<del>-</del>		
Datum der	Einreid	chung des Antrags		Datum de	er Fertigstellun	g dieses Berichts	
18/09/20	00			08.06.20	01		
Name und I Prütung bea	auftrag	schrift der mit der internationaten Behörde:	alen vorläufigen	Bevollmä	chtigter Bediei	nsteter states and the states and the states are the states and the states are the states and the states are th	<i>"</i>
<u>a</u>	D-80	päisches Patentamt 298 München +49 89 2399 - 0  Tx: 523656 ∈	epmu d	SCHEF	FZYK, I	We see that	SON WALL
		+49 89 2399 - 4465		Tol Nr .	40 90 2200 <u>9</u> E	O2	7

Tel. Nr. +49 89 2399 8602 -



### INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/00528

	l.	Grun	dlage	des	<b>Berichts</b>
--	----	------	-------	-----	-----------------

1.	Au eir	ıfforderung nach Art	ndteile der internationalen Anm Fikel 14 hin vorgelegt wurden, ge Fihm nicht beigefügt, weil sie kein n:	elten im Rahm	nen dieses Berichts als	s "ursprünglich
	1-1	18	ursprüngliche Fassung			
	Pa	tentansprüche, Nr	.:			
	1-1	16	eingegangen am	02/03/2001	mit Schreiben vom	28/02/2001
	Ze	ichnungen, Blätter	;			
	1/2	!	ursprüngliche Fassung			
	2/2		eingegangen am	02/03/2001	mit Schreiben vom	28/02/2001
2.	die	internationale Anm	he: Alle vorstehend genannten l eldung eingereicht worden ist, z chts anderes angegeben ist.	Bestandteile s ur Verfügung	standen der Behörde ir oder wurden in dieser	n der Sprache, in der eingereicht, sofern
		Bestandteile stand gereicht; dabei hand	en der Behörde in der Sprache: delt es sich um	zur Verfügu	ng bzw. wurden in die	ser Sprache
		die Sprache der Ü Regel 23.1(b)).	bersetzung, die für die Zwecke	der internation	nalen Recherche eing	ereicht worden ist (nacl
		die Veröffentlichur	gssprache der internationalen /	Anmeldung (n	ach Regel 48.3(b)).	
		die Sprache der Ü ist (nach Regel 55	bersetzung, die für die Zwecke .2 und/oder 55.3).	der internatior	nalen vorläufigen Prüf	ung eingereicht worden
3.	Hin inte	sichtlich der in der i ernationale vorläufig	nternationalen Anmeldung offer e Prüfung auf der Grundlage de	nbarten <b>Nucle</b> es Sequenzpro	otid- und/oder Amind otokolls durchgeführt v	osäuresequenz ist die vorden, das:
		in der international	en Anmeldung in schriftlicher Fo	orm enthalten	ist.	
		zusammen mit der	internationalen Anmeldung in d	computerlesba	arer Form eingereicht v	worden ist.
			achträglich in schriftlicher Form		_	
		bei der Behörde na	achträglich in computerlesbarer	Form eingere	icht worden ist.	
		Die Erklärung, daß	das nachträglich eingereichte s It der internationalen Anmeldun	schriftliche Se	quenzprotokoll nicht ü	ber den wurde vorgelegt.
			die in computerlesbarer Form e entsprechen, wurde vorgelegt.	erfassten Info	rmationen dem schriftl	ichen



# INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/00528

4.	Auf	grund der Änderunger	n sind folge	ende U	nterlagen for	tgefallen:
		Beschreibung,	Seiten:			
		Ansprüche,	Nr.:			
		Zeichnungen,	Blatt:			
5.			en nach A	uffassu	ıng der Behö	gen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den rde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich )).
		(Auf Ersatzblätter, die beizufügen).	e solche Ä	nderun	ngen enthalte	n, ist unter Punkt 1 hinzuweisen;sie sind diesem Berich
6.	Etw	aige zusätzliche Beme	erkungen:			
V.						ich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und d rungen zur Stützung dieser Feststellung
1.	Fest	tstellung				
	Neu	heit (N)		Ja: Nein:	Ansprüche Ansprüche	1-16
	Erfir	nderische Tätigkeit (E <sup>-</sup>	Γ)	Jạ: Nein:	Ansprüche Ansprüche	1-16
	Gew	verbliche Anwendbark	eit (GA)	Ja: Nein:	Ansprüche Ansprüche	1,8-16 2-7: siehe Sektion VIII/2).
2.		erlagen und Erklärung e Beiblatt	en			
VI.	Bes	timmte angeführte U	Interlagen			
1.	Best	timmte veröffentlichte	Unterlager	n (Rege	el 70.10)	

und / oder

2. Nicht-schriftliche Offenbarungen (Regel 70.9)

### si he Beiblatt

### VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist: si h B iblatt

		·
<i>.</i>		





### INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/00528

### VIII. Bestimmte B m rkungen zur internati nalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken: siehe Beiblatt

SEKTION V-----

Neuheit vorliegender Ansprüche kann anerkannt werden, denn eine sequentiellparallele Teilung einer Gewebeprobe in Scheibensegmente wird im zur Verfügung stehenden Stand der Technik nicht erwähnt. Auch scheint das Vorliegen einer erfinderischen Tätigkeit gegeben zu sein, denn eine Aufteilung und zugleich eine Separierung der aufgeteilten, d.h. aufgelösten, Gewebesegmente um ein Überwachsen der Tumorzellen von ebenfalls vorhandenen Normalzellen weitgehend zu vermeiden wird im zur Verfügung stehenden Stand der Technik nicht vorgeschlagen.

Demnach erfüllen vorliegende Ansprüche 1-7 die Erfordernisse des Art. 33(2)(3) PCT. Das gleiche gilt auch für Ansprüche 8-16, deren Gegenstand im zur Verfügung stehenden Stand der Technik auch nicht beschrieben oder nahegelgt wird.

SEKTION VI-----

DE-A-199 12 798

SEKTION VII-----

Für die in den neu-eingereichten Ansprüchen 1 und 2 durchgeführten Änderungen ist keine Basis in den ursprünglichen Anmeldungsunterlagen zu finden (Art. 34(2)(b) PCT).

SEKTION VIII-----

Gemäß vorliegender Beschreibung (siehe Seite 1, letzter Absatz) sind die im 1). Stand der Technik bisher verwendeten Zellkulturmedien nicht geeignet das Wachstum der Kreszellen zu fördern. Demnach scheint die Verwendung des erfindungsgemäßen Zellkulturmediums (siehe Seite 13, letzter Absatz bis Seite 15 der Anmeldung) zur erfolgreichen Durchführung des beanspruchten Verfahrens zur Kultivierung von Krebszellen erforderlich zu sein. Diesbezüglich wird die

	Ÿ		

Anmelderin darauf hingewiesen, dass alle Merkmale, die zur Durchführung einer Erfindung wesentlich sind in den unabhängigen Ansprüchen definiert werden müssen. Desweiteren scheinen die auf der Seite 16, erster Absatz angegebenen Verfahrensparameter zur Durchführung des beanspruchten Verfahrens, d.h. Wachstum der Krebszellen fördern und das der Normalzellen und Kontaminanten unterdrücken, wesentlich zu sein. Demnach sollten auch diese Merkmale in den unabhängigen Ansprüchen aufgeführt sein.

- 2). Anspruch 2 und demnach aufgrund des Rückbezugs zu Anspruch 2 auch Ansprüche 3-7 umfassen ein chirurgisches Verfahren. Demnach umfassen diese Ansprüche einen Gegenstand, der nach Auffassung dieser Behörde unter die Regel 67.1 (iv) PCT fällt. Daher wird über die gewerbliche Anwendbarkeit des Gegenstands dieser Ansprüche kein Gutachten erstellt (Artikel 34(4) a) (i) PCT).
- 3). Der Wortlaut des Anspruchs 1 ist unklar: es erfolgt eine sequentiell-parallele <u>Teilung</u>, die gemäß Anspruch 1 jedoch zu einer <u>Auflösung</u> der Gewebeprobe führt?! Zudem scheint der Ausdruck "sequentiell-parallel" in der Fachwelt kein üblicher Begriff zu sein. Das gleiche scheint auch für den Ausdruck "ortsaufgelöst" zu gelten. Demnach führt die Verwendung dieser Begriffe zu Einwänden bezüglich mangelnder Klarheit (Art. 6 PCT). Deshalb sollte dieser Begriff eventuell durch den in der Beschreibung auf Seite 4 verwendeten Begriff "aufgeteilt" ersetzt werden.

			•
		H	

GRSS59b

18

EPO-BERLIN
0 2 -03- 7001

#### Patentansprüche

5

10

15

1. Verfahren zur Kultivierung von Krebszellen aus Humangewebe für molekularbiologische Reihenuntersuchungen, dadurch gekennzeichnet, daß eine Gewebeprobe (6) auf der Grundlage ihrer heterogenen Struktur in bezug auf Tumorzellen, Normalzellen und Kontaminanten durch eine sequentiell-parallele Teilung mechanisch in Scheibensegmente örtlich aufgelöst wird und die einzelnen Gewebeprobensegmente separiert und weiter in Gewebefragmente geteilt werden und die gewonnenen kleinen, separierten Gewebefragmente und Gewebeflüssigkeiten der ortsaufgelösten Gewebeprobensegmente (6a) in einem bestimmten Zellkulturmedium unter vorgegebenen Kulturbedingungen bei Unterdrückung des störenden Einflusses von Normalzellen und Kontaminanten selek-

25

20

Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Gewebeprobe aus Feinnadel-, Aspirations- und intraoperativem Biopsien oder einer Resektatprobe gewonnen wird und zusammen mit den an der Gewebeprobe haftenden Erythrozyten aus dem Bereich der Entnahmestelle der Probe an dem betreffenden Patienten bis zur Herstellung der Gewebefragmente in ein Zellkulturmedium eingebracht wird.

tiv zum Wachstum gebracht werden.

30

35

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Zellkulturmedium zur Aufbewahrung der frischen Gewebeprobe mit dem zur Vermehrung der Tumorzellen vorgesehenen Zellkulturmedium identisch ist.

			•	
				v

20

GES559b

- 4. Verfahren nach Anspruch 2 und 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Gewebeprobe (6) zur Anpassung an das Zellkulturmedium in diesem mindestens 2 Stunden, jedoch nicht länger als 24 Stunden bei einer Temperatur zwischen 4°C und 12°C verbleibt.
- 5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch
  gekennzeichnet, daß die aus den ortsaufgelösten Gewebeprobensegmenten(6a) erzeugten Gewebefragmente und flüssigkeiten separat in mit einer Biomatrix beschichteten und mit dem Zellkulturmedium gefüllten
  Zellkulturflaschen unter einer Sauerstoffatmosphäre
  von 0,01 bis 3 % und einer Kohlendioxidatmosphäre von
  0,1 5 % sowie bei einer Luftfeuchte von 100 % und
  Temperaturen zwischen 30°C und 36,5°C kultiviert werden.
- 6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß eine bestimmte Zeit nach der Erstetablierung der Kultur und erfolgter Zelladhäsion das Zellkulturmedium in der Kulturflasche gegen ein neues, jedoch mit gleicher Zusammensetzung ausgetauscht wird.
- 7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Zellkulturmedium in Abhängigkeit von der Präsenz von Kontaminanten, wie Bakterien oder Pilze, bei gleichbleibendem oder verringertem Anteil an Antibiotika ausgetauscht wird.

		J.	•

GES559b

8. Zellkulturmedium zur Durchführung des Verfahrens nach den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass es aus anorganischen Salzen, nämlich

5	Ca(NO3)2	10-100 mg/L
	CaCl <sub>2</sub> • 2H <sub>2</sub> O	80-150 mg/L
	Kcl	200-1000 mg/L
	MgSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	150-700 mg/L
	NaCl	3000-10000mg/L
10	NaHCO,	1500-4000 mg/L
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	100-1000  mg/L;

## Aminosäuren, nämlich

10			
	L-Arginin • 4 HCl	10-500	mg/L
	L-Asparagin (freie Base)	10-500	mg/L
	L-Asparaginsäure	10-500	mg/L
	L-Cystin	10-500	mg/L
20	L-Glutaminsäure	10-500	mg/L
	L-Glutamin	10-500	mg/L
	Glycin	10-500	mg/L
	L-Histidin (freie Base)	10-500	mg/L
	L-Hydroxyprolin	10-500	mg/L
25	L-Isoleucin	10-500	mg/L
	L-Leucin	10-500	mg/L
	L-Lysin • HCL	10-500	mg/L
	L-Methionin	10-500	mg/L
	L-Phenylalanin	10-500	mg/L
30	L-Prolin	10-500	mg/L
	L-Serin	10-500	mg/L
	L-Threonin	10-500	mg/L
	L-Tryptophan	5-400	mg/L
	L-Tyrosin	10-500	mg/L
35	L-Valin	10-500	mg/L
	L-Alanin	10-300	mg/L

		•	
		•	

Vitaminen,	nämlich
------------	---------

	Biotin	0,01-10	mg/L
5	D-Ca-Pantothenat	0,01-10	mg/L
	Cholinchlorid	0,1-50	mg/L
	Folsäure	0,01-10	mg/L
	i-Inositol	0,1-100	mg/L
	Nicotinamid	0,01-10	mg/L
10	Pyridoxal • HCL	0,01-10	mg/L
	Riboflavin	0,1-100	μg/L
	Thiamin • HCL	0,1-50	mg/L
	Para-Aminobenzoesäure	1-1000	μg/L
	Vitamin B <sub>12</sub>	1-1000	μg/L
15	Niacin	1-100	μg/L
	Ascorbinsäure	1-5000	μg/L
	Folinsäure	1-100	μg/L
	Liponsäure	1-100	$\mu$ g/L
	Vitamin A (Acetat)	10-1000	μg/L
20	Pyridoxin • HCl	1-100	μg/L
	Niacinamid ·	1-100	μg/L
	lpha-Tocopherolphosphat	0-1000	μg/L
	sowie		
25			
23	D-Glucose	100-5000	mg/L
	Phenolrot	0,1-1000	mg/L
	Glutathion (reduziert)	0,01-10	mg/L
	Na-Pyruvat	0,1-50	nM
30	Epidermaler Wachstumsfakt		
	(Epidermal Growth Factor,		
	-rekombinant	1-3000	ng/L
	Fötales Rinderserum (FBS		<del></del>
	Insulin vom Rind (Lyophil		-50 ma/I.
35		, 0,2	

und Antibiotika zusammengesetzt ist.

	4		
			*

10

15

20

25

GES559b

9. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1, zur ortsaufgelösten Aufbereitung der Gewebeprobe, gekennzeichnet durch einen Schneidapparat zum sequentiell-parallelen Zerteilen der Gewebeprobe (6) in einzelne, voneinander getrennte Gewebesegmente (6a) und der entsprechenden Schnittstelle zugehöriger Gewebeflüssigkeit, bestehend aus einer in Kammern mit Unterkammern (1a1 bis 1a10, 1b1 bis 1b5, 1c1 bis 1c3, 1d und 1el bis 1el0) aufgeteilten Auffangschale (1), einer auf dieser lösbar gehaltenen Schneidplatte (2) mit zur Auffangschale (1) hin teilweise offenen Schneidrinnen (4) sowie einem Schneidmesserrahmen (3) für Schneidmesser (10), wobei die Anordnung der Schneidmesser (10) im Schneidmesserrahmen (3) mit der der Schneidrinnen (4) in der Schneidplatte (2) übereinstimmt und jeder Schneidrinne (4) eine sich unter dieser befindenden einzelnen Unterkammer zugeordnet ist; sowie ein Zerkleinerungsgerät zur weiteren Aufbereitung der ortsaufgelösten Gewebeprobensegmente (6a), die eine in Kammern (13a bis 13e) aufgeteilte Flüssigkeits-Auffangschale (13), eine auf dieser lösbar angebrachte Aufbereitungsplatte (15) mit Vertiefungen (16) sowie Drehstempel (18) mit Drehstempelmessern (19) umfaßt, wobei die Vertiefungen (16) Löcher (17) aufweisen und sich jeweils oberhalb einer Kammer (13a bis 13e) befinden und die Drehstempel (18) den Vertiefungen (16) zugeordnet sind.

30

35

10. Vorrichtung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Schneidplatte (2) eine senkrecht zu den Schneidrinnen (4) verlaufende und mittig angeordnete aufgerauhte Auflagefläche (5) zur stabilen Lagerung der Gewebeprobe (6) aufweist.

			÷	•
				1
		÷		
•				

GES559b

11. Vorrichtung nach Anspruch 9 und 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Schneidrinnen (4) im Bereich der Auflagefläche (5) zu der darunterliegenden Unterkammer hin offen sind, so daß beim Schneiden gebildete Gewebeflüssigkeit oder Gewebestücke getrennt in der jeweiligen Unterkammer aufgefangen werden.

10

5

12. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Breite der Schneidrinnen (4) größer als die Stärke der Schneidmesser (10) ist.

15

20

13. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Schneidmesser (10) an einer Deckplatte des Schneidmesserrahmens (3) befestigt sind.

25

14. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Schneidmesser (10) in dem Schneidmesserrahmen (3) verspannte Schneiddrähte bilden.

30

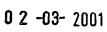
35

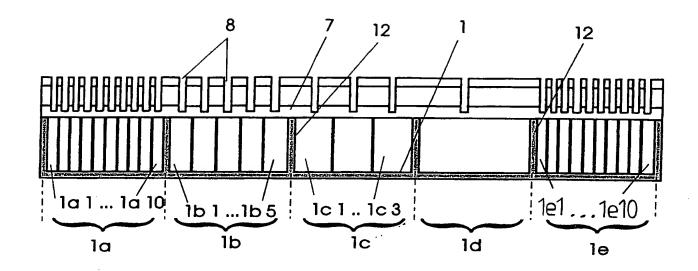
15. Vorrichtung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Schneidplatte (2) und die Aufbereitungsplatte (15) jeweils in Führungsschienen (7 bzw. 14) an der Auffangsschale (1) bzw. der Flüssigkeits-Auffangschale (13) gehalten sind, wobei in den Führungsschienen (7) für die Schneidplatte (2) mit den Schneidrinnen (4) fluchtende Einschnitte (8) ausgebildet sind.

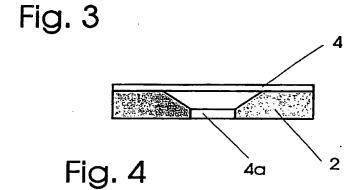
GES559b

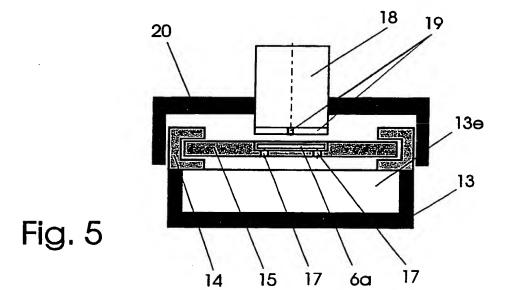
16. Vorrichtung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Drehstempel (18) in Bohrungen einer Drehstempel-Halteplatte (20) in senkrechter Richtung bewegbar sowie drehbar angeordnet sind.

		÷*	
			•
			•
	•		









		5	

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N5/08 C12M3/04

G01N1/06

C12N5/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Р,Х	DE 199 12 798 C (JORDAN ANDREAS) 17 February 2000 (2000-02-17) the whole document	1-16
	WO 97 23602 A (NESTLE SA ;BAUR MARKUS (CH); MACE CATHERINE (CH); MALNOE ARMAND (C) 3 July 1997 (1997-07-03) page 15, line 8-31; example 6  -/	1,5-8
X Fur	ther documents are listed in the continuation of box C. X Patent family member	s are listed in annex.

Special categories of cited documents:  A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention			
<ul> <li>"E" earlier document but published on or after the international filing date</li> <li>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or</li> </ul>	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone			
which is cited to establish the publication date or another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such docu-			
*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	ments, such combination being obvious to a person skilled in the art.			
*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	*&* document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report			
28 November 2000	07/12/2000			
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2	Authorized officer			
NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Mateo Rosell, A.M.			



et	el Applic	ation No
CT/D	00/0	0528

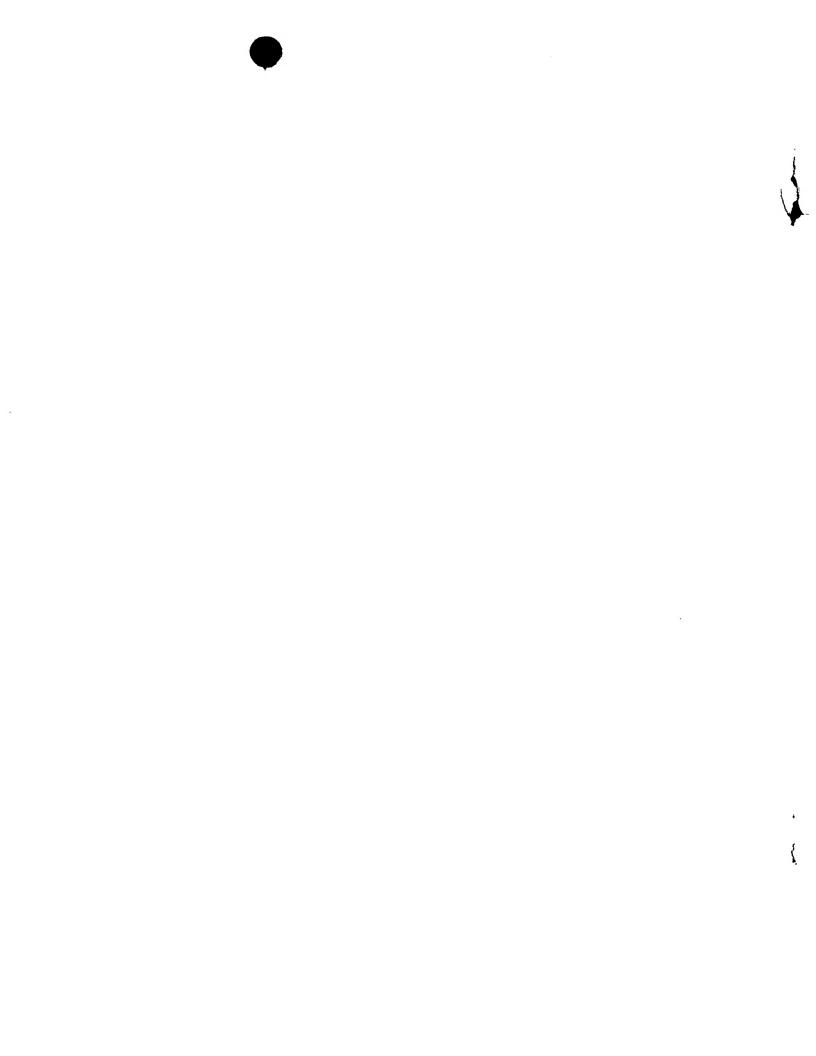
legory ° Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	
	Relevant to claim No.
IMAGAWA W ET AL: "SERUM-FREE GROWTH OF NORMAL AND TUMOR MOUSE MAMMARY EPITHELIAL CELLS IN PRIMARY CULTURE" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 79, no. 13, 1982, pages 4074-4077, XP000965632 1982 ISSN: 0027-8424 the whole document	1,5-8
PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1995, no. 11, 26 December 1995 (1995-12-26) & JP 07 218398 A (SEITAI KAGAKU KENKYUSHO:KK), 18 August 1995 (1995-08-18) abstract	9,11
WO 95 24464 A (BAXTER INT ;UNIV NORTHWESTERN (US)) 14 September 1995 (1995-09-14) abstract; figures 1,2	9,11
DE 43 34 281 A (DORNHAN MASCHF GMBH) 13 April 1995 (1995-04-13) claims 1,2; figures 1-3	9
US 5 985 290 A (LEVITSKY HYAM I ET AL) 16 November 1999 (1999-11-16) page 5, line 15 -page 6, line 19	1,5-8

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

on patent family members

at Application No /DE 00/00528

			,			
	atent docum nt d in search report		Publication date		tent family emb r(s)	Publication date
DE	19912798	С	17-02-2000	WO	0053728 A	14-09-2000
WO	9723602	A	03-07-1997	AU	1305497 A	17-07-1997
				BR	9612256 A	13-07-1999
				CZ	9801945 A	11-11-1998
				EP	0780469 A	25-06-1997
				EP	0877797 A	18-11-1998
				HU	9903742 A	28-03-2000
					00506374 T	30-05-2000
				NO	982810 A	21-08-1998
				PL	327320 A	07-12-1998
				SK	83598 A	11-01-1999
JP	07218398	A	18-08-1995	NONE		
WO	9524464	A	14-09-1995	AU	687531 B	26-02-1998
				AU	2060195 A	25-09-1995
				CA	2162465 A	14-09-1995
				EP	0698085 A	28-02-1996
				IL	112944 A	18-02-1997
				JP	9501324 T	10-02-1997
				US	5512480 A	30-04-1996
DE	4334281	Α	13-04-1995	AT	186478 T	15-11-1999
				DΕ	9321578 U	09-03-2000
				EP	0647475 A	12-04-1995
		Α	16-11-1999	US	6033674 A	07-03-2000
US	5985290	A	10-11-1333	บว	00330/4 M	



Inti a	es Aktenzeicher
PCT	00/00528

Λ.	KI ASSISTANSHING	DES ANMELD	UNGSGEGENSTANDES
Ŧ'6		5/08	C12M3/04

G01N1/06

C12N5/06

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klasslfikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ

	SENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN	Betr. Anspruch Nr.
Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, sowelt erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Dett. Alispidor 14.
P,X	DE 199 12 798 C (JORDAN ANDREAS) 17. Februar 2000 (2000-02-17) das ganze Dokument	1–16
A	WO 97 23602 A (NESTLE SA; BAUR MARKUS (CH); MACE CATHERINE (CH); MALNOE ARMAND (C) 3. Juli 1997 (1997-07-03) Seite 15, Zeile 8-31; Beispiel 6  -/	1,5-8

X	Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen
---	---

Siehe Anhang Patentfamilie

- Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen
- 'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem Internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- \*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft er-scheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
   P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahellegend ist
- \*& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

07/12/2000

Bevoltmächtigter Bediensteter

28. November 2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016

Mateo Rosell, A.M.

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

		751/DE 00/00528
	ung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN	
Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommer	nden Teile Betr. Anspruch Nr.
A	IMAGAWA W ET AL: "SERUM-FREE GROWTH OF NORMAL AND TUMOR MOUSE MAMMARY EPITHELIAL CELLS IN PRIMARY CULTURE" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, Bd. 79, Nr. 13, 1982, Seiten 4074-4077, XP000965632 1982 ISSN: 0027-8424 das ganze Dokument	1,5-8
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1995, no. 11, 26. Dezember 1995 (1995-12-26) & JP 07 218398 A (SEITAI KAGAKU KENKYUSHO:KK), 18. August 1995 (1995-08-18) Zusammenfassung	9,11
A	WO 95 24464 A (BAXTER INT ;UNIV NORTHWESTERN (US)) 14. September 1995 (1995-09-14) Zusammenfassung; Abbildungen 1,2	9,11
A	DE 43 34 281 A (DORNHAN MASCHF GMBH) 13. April 1995 (1995-04-13) Ansprüche 1,2; Abbildungen 1-3	9
P,X	US 5 985 290 A (LEVITSKY HYAM I ET AL) 16. November 1999 (1999-11-16) Seite 5, Zeile 15 -Seite 6, Zeile 19	1,5-8

# INTERNATIONALER RECERCHENBERICHT Angaben zu Veröffentlichungen, die ben Patentfamilie gehören

ales Aktenzeichen
PCT/DE 00/00528

					,
tm Recherchenberich ngeführtes Patentdokur		Datum der V röffentlichung		itglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 19912798	С	17-02-2000	WO	0053728 A	14-09-2000
WO 9723602	A	03-07-1997	AU	1305497 A	17-07-1997
			BR	9612256 A	13-07-1999
			CZ	9801945 A	11-11-1998
			EP	0780469 A	25-06-1997
			EP	0877797 A	18-11-1998
			HU	9903742 A	28-03-2000
				000506374 T	30-05-2000
			NO	982810 A	21-08-1998
			PL	327320 A	07-12-1998
			SK	83598 A	11-01-1999
JP 07218398	Α	18-08-1995	KEIN	E	
WO 9524464	A	14-09-1995	AU	687531 B	26-02-1998
			AU	2060195 A	25-09-1995
			CA	2162465 A	14-09-1995
			EP	0698085 A	28-02-1996
			IL	112944 A	18-02-1997
			JP	9501324 T	10-02-1997
~==========			US	5512480 A	30-04-1996
DE 4334281	Α	13-04-1995	AT	186478 T	15-11-1999
			DE	9321578 U	09-03-2000
			EP	0647475 A	12-04-1995
US 5985290	Α	16-11-1999	US	6033674 A	07-03-2000
			US	6087174 A	11-07-2000

